

Aus dem Institut für Zoonosenforschung
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt a. M.
Direktor: Prof. Dr. G. Schoop

Beobachtungen über die Wärmestabilität und
2-Mercaptoäthanolresistenz von Antikörpern
bei Hund und Maus nach experimenteller
Toxoplasmainfektion

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jutta Kreibitz geb. Pergande
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 1969
Journal-Nr. 641



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Zoonosenforschung
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt a.M.
Direktor: Prof.Dr.G.Schoop

Beobachtungen über die Wärmestabilität und
2-Mercaptoäthanolresistenz von Antikörpern
bei Hund und Maus nach experimenteller
Toxoplasmainfektion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen
Fakultät der
Freien Universität Berlin
vorgelegt von
Jutta Kreibitz geb. Pergande
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 1969
Journal-Nr. 641

Gedruckt mit Genehmigung der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin



Dekan: Prof.Dr.K.Bronsch
Referent: Prof.Dr.G.Schoop
Korreferent: Prof.Dr.J.Boch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.Februar 1969

Meinen Eltern

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	1
1. Molekulare Grundstruktur der Antikörper	
2. Untergruppen der Immunglobuline	2
3. Die Bedeutung der IgM Antikörper bei der Ausbildung der Immunität, insbesondere bei der Toxoplasmose	3
4. Problemstellung dieser Arbeit	4
B. Eigene Versuche	5
I. Material und Methode	
1. Versuchstiere, Haltung, Fütterung	
1a. Hunde	
1b. Mäuse	
2. Infektionsmaterial und Infektionsart	
2a. Infektion der Hunde	
aa) Orale Infektion mit dem Toxoplasma-DX-Stamm	
ab) Intravenöse Reinfektion mit dem BK-Stamm	6
2b. Infektion der Mäuse	
3. Zeitpunkte der Serumgewinnung	
4. Bestimmung des Antikörper-Titers	7
4a. Ausführung des Sabin-Feldman-Tests und der Komplementbindungsreaktion	
4b. Durchführung der 2-Mercaptoäthanol-Behandlung der Sera	
II. Versuchsergebnisse	9
1. Befunde an Hunden	
1a. Orale Infektion	
aa) Klinischer Befund	
ab) Serologischer Befund	
Ergebnisse des Sabin-Feldman-Tests	
Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion	10
1b. Intravenöse Reinfektion	
ba) Klinischer Befund	

	Seite
bb) Serologischer Befund	12
Ergebnisse des Sabin-Feldman-Tests	
Ergebnisse der Komplementbindungs- reaktion	
2. Befunde an Mäusen	13
2a. Reaktion im Sabin-Feldman-Test	
2b. Reaktion in der Komplementbindungs- reaktion	
III. Diskussion	14
IV. Zusammenfassung	18
V. Tabellen und Abbildungen	19
Literaturangaben	

A. Einleitung und Schrifttum

Antigen-Antikörperreaktionen in vitro darzustellen, ist ein wertvolles Hilfsmittel in der Diagnostik vieler Infektionskrankheiten.

Sind auch die biochemischen Vorgänge, die im Organismus nach einem antigenen Reiz zur Bildung spezifischer Antikörper führen, noch nicht restlos geklärt, so kennt man doch die molekulare Grundstruktur der Antikörper (1).

Ein Antikörpermolekül besteht aus vier Polypeptidketten, zwei identischen Hauptketten - H- oder A-Ketten, MG 50.000 - und zwei halb so großen identischen L- oder B-Ketten, MG 20.000. Diese Ketten sind durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden. Beide Kettenarten bestehen aus einem konstanten und einem variablen Teil. Der konstante Teil einer Kette hat die gleiche Aminosäuresequenz in allen Molekülen dieser Art, variiert aber zwischen den Tierspezies und zeigt auch für eine Spezies eine Heterogenität insofern, als für den Aufbau des konstanten Teiles zwei verschiedene L-Ketten - Kappa und Lambda - und mindestens acht verschiedene H-Ketten - My, Gamma 1, Gamma 2, Gamma 3, Gamma 4, Alpha, Delta und Epsilon - zur Verfügung stehen. Somit ergeben sich für den Aufbau des konstanten Teils eines Antikörpermoleküls 16 verschiedene Möglichkeiten, wobei jede der 16 verschiedenen molekularen Strukturen dieselbe Antikörperspezifität darstellen kann.

Am variablen Teil jeder L-Kette können 10^7 Aminosäuren permutieren; dies erklärt somit die Antigenspezifität und Diversität der Antikörper eines Individuums.

Die Diversität der Antikörper wird außer ihrer Spezifität und Zugehörigkeit zu einer Immunglobulinklasse durch Allotypie, Idiotypie, Avidität und unterschiedliche Ladung bedingt.

Alle diese Eigenschaften erklären sich durch geringgradige Änderung in der Aminosäuresequenz.

Immunelektrophoretisch läßt sich die heterogene Gruppe der Immunglobuline in drei Untergruppen einteilen, die IgG- oder 7 S Gamma-Globuline mit einem Molekulargewicht von 150.000, die IgM- oder 19 S Gamma-Globuline mit einem Molekulargewicht von 1.000.000 und die IgA mit einer ähnlichen Molekülgröße wie die IgG (2).

In den L-Ketten bestehen zwischen diesen drei Untergruppen keine Unterschiede, er liegt in den H-Ketten, die einen ungleichen Gehalt an Kohlenhydraten aufweisen (2). Die Bindungsfläche des Antikörpers beträgt 1 % der Oberfläche des Antikörper-Moleküls, entspricht somit der Position von etwa 10 - 20 Aminosäuren. Die Bindungsfähigkeit der IgG ist bivalent. Höhermolekulare Antikörper besitzen wahrscheinlich zwei Bindungsstellen je 7 S-Untereinheit (2).

Alle drei Immunglobuline sind reaktive Antikörper; die IgA spielen die ausschlaggebende Rolle bei der Hautreaktion (2); ihnen fehlt dagegen die Fähigkeit, Komplement zu fixieren, die die IgG und IgM besitzen.

Phylogenetisch die ältesten Antikörper sind die IgM (3), sie werden auch als erste vom Organismus nach einem primären Antigen-Reiz gebildet und nach 1-2 Wochen durch 7 S-Antikörper ersetzt.

Bei einer Reinfektion besteht diese zeitliche Diskrepanz in der Produktion von 19 S- und 7 S-Antikörpern nicht; das Individuum produziert unmittelbar 7 S-Antikörper (3).

Nach Svehag und Mandel (4) steht das Auftreten der beiden Antikörper-Arten in Relation zur zugeführten Antigen-Menge; sehr kleine Antigen-Dosen induzieren nur 19 S-Antikörper. Mittels 2-Mercaptoethanol (2-ME) lassen sich die IgM in 6,5 S Untereinheiten aufspalten;

sie besitzen dann keine Antikörpereigenschaften mehr (3; 5).

Es ist somit denkbar, durch Messung der 19 S- und 7 S-Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen in einer Serumprobe schnell einen Aufschluß über das Infektionsgeschehen zu erhalten. So sehen es Remington und Miller (6) als Beweis für eine akute congenitale Toxoplasmose an, wenn in der Serumprobe des Säuglings vorwiegend Antitoxoplasma - IgM-Antikörper - zu finden sind.

Aslund und Mitarbeiter (7) berichten über experimentelle Listeriose bei Schaf und Rind. Auch bei nicht infizierten Kontrollen treten Agglutinationen auf. Nach Eliminierung der 19 S-Globuline agglutinieren nur noch die Sera, die von Tieren stammen, die einer Infektion unterworfen wurden. Rose und Mitarbeiter (8; 9) weisen bei Versuchen mit *Brucella abortus* beim Rind unspezifische, hitzelabile, durch 2-ME zerstörbare Seroagglutinine nach.

Te Funga (10) und Te Funga und Mitarbeiter (11) untersuchen bei Schafen nach Infektion mit Toxoplasmen die auftretenden Antikörper auf ihre Hitzestabilität. Sie finden, daß ein Erhitzen der Sera in den ersten Tagen nach der Infektion auf 60° C für eine Stunde alle Antikörper zerstört. Sie charakterisieren sie mittels Chromatographie als Immunglobuline der IgM-Klasse. Einen Anstieg hitzestabiler - 60° C - Antikörper finden sie am 6. Tag in allen Sera und vom 14. Tag an bleibt die Titerhöhe durch Temperaturen von 60° C unbeeinflusst.

Auch Steib und Mitarbeiter (12) weisen in den ersten 4 Tagen bei der Maus und bei Kaninchen nach intra-abdominaler Toxoplasma-Infektion nur IgM-Antikörper nach.

Berger (13) zeigt in seiner Arbeit, daß nach Erwärmen der zur Diagnostik eingesickten Rindersera auf 60° C,

bzw. durch Behandlung mit 2-ME der größte Teil der vorher im Sabin-Feldman-Test (SFT) positiv reagierenden Sera negativ anzeigt.

Nach experimenteller Infektion besteht diese Diskrepanz in der 2. Woche p. i. nicht mehr. Mittels Gel-filtration an Sephadex G 200 wird gezeigt, daß es sich bei den wärmelabilen und 2-ME-empfindlichen Antikörpern um Makroimmunglobuline - IgM handelt.

In vorliegender Arbeit sollen an Modellversuchen

1. die beobachtete Korrelation zwischen Wärmelabilität und 2-ME-Empfindlichkeit der mittels Sabin-Feldman-Test (SFT) und Komplementbindungsreaktion (KBR) zu messenden Antikörpertiter verfolgt und 2. die nach oraler Toxoplasmainfektion mit geringen Infektionsmengen auftretenden Immunglobuline bestimmt werden.
3. Soll untersucht werden, wie die gleichen Tiere später auf eine hohe Infektionsdosis reagieren und 4. soll ein Tier der gleichen Art einer hohen Primärinfektion ausgesetzt werden.

Hund und Maus werden als Modell gewählt, da sie als zuverlässige Antikörperbildner nach Toxoplasmainfektion bekannt sind und sich die KBR mit den Sera dieser Tiere ohne Modifikationen ausführen läßt (14; 15; 16; 17; 18).

B. Eigene Versuche

I. Material und Methode

1. Versuchstiere, Haltung, Fütterung

1a. Hunde

Vier im SFT und in der KBR negativ reagierende Hunde werden für die Versuche von der Tierversuchsanlage der Universität Frankfurt/M. (Leiter: Priv.-Doz. Dr.med.vet. K. Gärtner) zur Verfügung gestellt.

Es sind dies:

- Hund 1 - Collie-Hündin, 1 1/2 Jahre alt,
- Hund 2 - Collie-Hündin, 1 1/2 Jahre alt,
- Hund 3 - Schäferhündin, 4 1/2 Jahre alt und
- Hund 4 - Pudel-Rüde, 8 Monate alt.

Die Hunde werden im Zwinger (1 und 3) bzw. in Einzelkäfigen (2 und 4) gehalten und mit Altromin-Alleinfutter für Hunde ernährt.

1b. Mäuse

Je zwei mal 15 männliche Mäuse, 16 bis 18 g schwer, des NMRI-Stammes aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, werden in Makrolonkäfigen gehalten und mit einer Altromin-Standarddiät ernährt.

2. Infektionsmaterial und Infektionsart

2a. Infektion der Hunde

aa) Orale Infektion mit dem Toxoplasma-DX-Stamm

Die Infektion erfolgt mit dem bei Mäusen zystenbildenden DX-Stamm, der aus dem Institut für medizinische Parasitologie der Universität Bonn stammt. Zehn Wochen vor der oralen Infektion der Hunde werden Mäuse des NMRI-Stammes mit Toxoplasmen des DX-Stammes intra-abdominal infiziert. Die Infektionsdosis der Mäuse beträgt 0,5 ml einer 10%igen Gehirnzerreibung.

Hund 1 erhält ein Gehirn einer dieser Versuchsmäuse,

Hund 2 drei Gehirne und

Hund 3 eineinhalb Gehirne

jeweils in einer durchgefrorenen Rindfleischprobe per os verabfolgt. Bei allen Tieren wird darüber gewacht, daß der Schluckreflex eintritt.

ab) Intravenöse Infektion

Hierfür werden frisch aus dem Peritoneal-Exsudat von NLRI-Mäusen gewonnene Toxoplasmen des BK-Stammes benutzt, der für Mäuse stark virulent ist.

Hund 1 erhält am 51.Tag nach der oralen Infektion ca. 30 Mill. Toxoplasmen in die V. cephalica antebra-
chii injiziert; Hund 2 am 83.Tage ca. 70 Mill.
und Hund 3 am 24.Tage ca. 26 Mill. Der Hund 4, der einer experimentellen oralen Infektion nicht ausgesetzt war, erhält 50 Mill. Toxoplasmen i.v.

2b. Infektion der Mäuse

Je Tier werden 0,5 ml einer 10%igen Gehirnsuspension, die Toxoplasmen des DX-Stammes enthält, intraabdominal appliziert.

3. Zeitpunkte der Serumgewinnung

Den Hunden werden täglich bis zum 21.Tage p. i. jeweils 5 ccm Blut aus der V. ceph. antebr. entnommen. Dann erfolgen die Blutentnahmen jeden dritten Tag, ab dem 2.Monat bis zur Beendigung des Versuches nur noch einmal wöchentlich.

Die Mäuse sind in zwei Gruppen zu je 15 Tiere geteilt. Jedem Tier einer Gruppe werden jeden zweiten Tag ca. 15 Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen.

Die Blutproben werden nach der Entnahme zentrifugiert und die anfallenden Sera bei -20° C aufbewahrt.

4. Bestimmung des Antikörper-Titers

4a. Ausführung des Sabin-Feldman-Tests (SFT) und der Komplementbindungsreaktion (KBR)

SFT und KBR werden analog den Empfehlungen für die Durchführung der Toxoplasma-Seroreaktion der beratenden Kommission des Bundesgesundheitsamtes von Oktober 1965 im Toxoplasmose-Labor des Instituts ausgeführt (19).

Für die KBR wird Eihautantigen und Kontrollantigen aus dem Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn bezogen. Als Kontrollen dienen bei den Seroreaktionen positive und negative Humanstandardsera.

Vor jedem Ansatz werden die Serumproben gedrittelt. Ein Drittel wird - wie empfohlen - bei 56° C für 30 Minuten inaktiviert, das zweite Drittel für die gleiche Zeit bei 60° C, und das verbleibende Drittel wird mit 2-Mercaptoäthanol (2-ME) behandelt.

Da bei der 2-ME-Behandlung bereits eine Verdünnung von 1:6 eintritt, ist die unterste zu bestimmende Verdünnungsstufe 1:24. Diese entspricht der Stufe 1:4 beim üblichen SFT. Der SFT wird daher in halben Stufen, in Verdünnungen von 1:24 (1:4), 1:50, 1:100 (1:16), 1:200, 1:400 (1:64), 1:1600 (1:256) usw. ausgeführt.

4b. Durchführung der 2-Mercaptoäthanol-Behandlung (2-ME) der Sera

Das Serum wird zur Bestimmung der 2-ME-Resistenz der Antikörper mit der doppelten Menge phosphatgepufferter Kochsalzlösung¹⁾ verdünnt. Eine Hälfte der Serumver-

1) 72,0 ml m 15 Na_2HPO_4
28,0 ml m 15 KH_2PO_4
8,5 ml NaCl ad 100 ml

dünnung wird mit der gleichen Menge (0,5 ml) einer frisch hergestellten 0,2-molaren 2-ME²⁾-Lösung, die zweite als Kontrolle mit 0,5 ml Puffer versetzt. Beide Ansätze werden eine Stunde im Wasserbad bei 37° C belassen. Danach werden die Proben zur Eliminierung des 2-ME für 48 Stunden bei 4° C gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert.

2) "Serve"-Entwicklungslabor, Heidelberg

II. Versuchsergebnisse

1. Befunde an Hunden

1a. Orale Infektion

aa) Klinischer Befund

Nach peroraler Infektion steigt bei den Hunden in der ersten Woche nach der Infektion die Körpertemperatur; bei Hund 1 auf $40,3^{\circ}\text{C}$, bei Hund 2 auf $39,9^{\circ}\text{C}$ und bei Hund 3 auf $39,4^{\circ}\text{C}$, fällt in der zweiten Woche auf $38,6^{\circ}\text{C}$ ab und behält diesen Stand dann bei. Krankheitserscheinungen werden nicht festgestellt.

ab) Serologischer Befund

1) Ergebnisse des Sabin-Feldman-Tests

Hund 1 weist erstmalig am 11. Tag p. i. einen Titer von 1:4 nach Inaktivierung bei 56°C auf (Abb. 1). Am 13. Tag steigt der Titer auf 1:100; gleichzeitig ergibt das bei 60°C für 30 Minuten inaktivierte Serum einen Titer von 1:24 und das mit 2-ME behandelte einen Wert von 1:50. Einen Tag später hat sich der Titer nach Inaktivierung bei 56°C nicht geändert, steigt aber am 15. Tag auf 1:200 und behält diesen Wert bis zum 17. Tag. Nach 2-ME-Behandlung oder Inaktivierung bei 60°C beträgt der Titer vom 14. bis zum 17. Tag einheitlich 1:50. Am 21., 24., 25. und 31. Tag fällt der SFT nach Inaktivierung bei 60°C negativ aus, hat bei 56°C einen Titer von 1:100 und nach 2-ME-Behandlung einen solchen von 1:24. Am 51. Tag, dem Zeitpunkt der Reinfektion, haben alle drei Ansätze einen Wert von 1:24.

Bei Hund 2 treten wie bei Hund 1 am 11. Tag p. i. nach Inaktivierung bei 56°C im SFT nachweisbare Antikörper auf (Abb. 1). Am 14. Tag sind auch 60°C -resistente Antikörper nachweisbar: am 16., 17. und 21. Tag beträgt der Titer nach Inaktivierung bei 60°C oder nach 2-ME-Behandlung 1:24, der Titer nach Inaktivierung

bei 56° C 1:100. Am 23. und 24. Tag sind die entsprechenden Werte 1:200 und 1:400. Ab 27. bis zum 60. Tag ist der Titer einheitlich 1:400. Am 83. Tag, dem Tag der Reinfektion, fällt der Sabin-Feldman-Titer nach Inaktivierung bei 56° C auf 1:200, bei 60° C oder nach 2-ME-Behandlung auf 1:100.

Hund 3 zeigt ein von dem bei den beiden besprochenen Tieren abweichendes Verhalten. Es lassen sich schon am 6. Tag 2-ME-resistente Antikörper in der gleichen Titerhöhe wie nach Inaktivierung bei 56° C nachweisen (Abb. 1). Der Sabin-Feldman-Titer bleibt nach 2-ME-Behandlung konstant bei 1:200, steigt aber nach Inaktivierung bei 56° C am 7. Tag auf 1:800 an. In der Zeit vom 13. bis zum 19. Tag ist auch der Titer bei der Inaktivierungstemperatur von 56° C 1:200; am 24. Tag, dem Zeitpunkt der Reinfektion, haben alle Ansätze einen Wert von 1:100.

Die einzelnen Daten für alle drei Hunde sind in Tabelle 1 angegeben.

2) Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion

Nur bei Hund 2 werden vom 23. Tag ab komplementbindende Antikörper in der Stufe 1:5 gefunden, die nach Behandlung der Sera mit 2-ME nicht mehr nachweisbar sind (Tabelle 1; Abbildung 1).

1b. Intravenöse Reinfektion mit dem BK-Stamm

ba) Klinischer Befund

Nach der intravenösen Inokulation lebender Toxoplasmen vermindert sich die Gesamtleukozytenzahl, sie fällt bei Hund 1 von 9.800, am Tage der Reinfektion, auf 7.800 am 2. Tag p. i., auf 5.200 am 3. Tag und hat am 5. Tag p. i. mit 5.800 ihren tiefsten Stand erreicht. Vom 7. Tag an, wo der Wert 7.800 ermittelt wird, steigt die Gesamtleukozytenzahl dann auf 10.450 am 9. Tag,

bis zu 11.900 am 12. Tag p. i.

Hund 2 hat am 1. Tag p. i. einen Leukozytenwert von 7.500, welcher am 2. Tag p. i. bereits auf 4.600 absinkt, am 3. Tag auf den tiefsten Wert von 4.050. Am 5. Tag steigt die Leukozytenzahl auf 7.600, am 10. Tag auf 7.800, am 11. auf 8.400 und erreicht 9.500 am 14. Tag p. i.

Hund 3 hat nach dem Ausgangswert von 8.700, einen Tag p. i., bereits am 2. Tag p. i. die niedrigste Leukozytenzahl von 6.000, am 3. und 4. Tag dann 6.400, am 5. Tag steigt der Wert auf 8.300 und am 8. Tag beträgt die Gesamtleukozytenzahl 10.800.

Auch Hund 4, der nur einmal und nur intravenös infiziert wurde, hat am 2. Tag p. i. den niedrigsten Leukozytenwert von 8.300 gegenüber 11.650 am Tage der Infektion selbst. Am 3. Tag p. i. beträgt der Wert 8.700, am 4. Tag 9.250 und am Vortage seines Todes fällt die Gesamtleukozytenzahl noch einmal auf 7.200.

Die Körpertemperatur bewegt sich bei Hund 1, 2, und 3 um $39,5^{\circ}$ C.

Bei Hund 4 dagegen steigt sie am 2. Tag p. i. auf $40,2^{\circ}$ C an und beträgt am 6. Tag p. i. $41,4^{\circ}$ C. Der Hund ist ab dem 4. Tag stark apathisch und nimmt kein Futter an. Am 7. Tag stirbt das Tier. Bei der Sektion zeigt sich als einziger pathologischer Befund ein sehr starker *Dipylidium canium*-Befall des Dünndarms.

Um die Todesursache zu klären, muß berücksichtigt werden, daß der Hund kurze Zeit vor der Toxoplasma-Infektion (14 Tage) die Staupe überwunden hatte. Somit kann die Toxoplasma-Infektion allein als Todesursache nicht angeführt werden, wohl aber, daß der aufgrund der überstandenen Infektionskrankheit und des starken Parasitenbefalls ohnehin geschwächte Organismus sich mit dieser neuen Infektion nicht auseinandersetzen konnte, so daß dieses Tier bereits eine Woche nach der Toxoplasma-Infektion starb.

Aus Leber und Lunge lassen sich Toxoplasmen im Mäuseinokulationsversuch anzüchten.

bb) Serologischer Befund

1) Ergebnisse des Sabin-Feldman-Tests

Die im SFT ermittelten Titer gehen aus den Abbildungen 2 - 5 hervor. Bei Hund 1, 2 und 3 kommt es zwischen dem 4. und dem 5. Tag nach der Infektion zu einem deutlichen Titeranstieg, der schon am 6. Tag seinen Maximalwert von 1:25.000 bzw. 1:96.000 erreicht, welcher bis zum Versuchsende am 17. Tag nach der Reinfektion bestehen bleibt. Es wird kein bedeutender Unterschied im Titer in Abhängigkeit von der Behandlung der Sera beobachtet. Die Daten sind in Tabelle 2 angegeben.

Hund 4 reagiert in den ersten 3 Tagen negativ, hat am 4. Tag nach der Inaktivierung bei 56° C einen Titer von 1:50, am 5. Tag nach Inaktivierung bei 56° C einen Titer von 1:800, der durch 2-ME-Behandlung auf einen Wert von 1:24, durch Inaktivierung bei 60° C auf 1:100 reduziert wird. Am 6. Tag p. i. sind die entsprechenden Titer 1:3.200 (56° C), 1:800 (60° C) und 1:50 (2-ME). (Tabelle 2).

Bemerkenswert ist, daß nach der oralen Infektion bei allen Tieren im Laufe der Infektion in unterschiedlicher Stärke ein Prozonophänomen festgestellt wird, welches auch nach intravenöser Infektion - häufig bis zu der Titerstufe 1:256 - beobachtet wird. °

2) Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion

Hund 1 und 3 reagieren im Gegensatz zu Hund 2 am Tage der Reinfektion nicht in der KBR. Am 4. Tag r. i. reagieren alle drei Tiere positiv, wobei der Titer nach Behandlung mit 2-ME bei Hund 1 und 3 verschwindet. Am 5. Tag treten 2-ME-resistente Antikörper auf, die 1 - 2 Titerstufen unter denjenigen der nur bei 56° C inaktivierten Sera liegen.

Diese Diskrepanz besteht für Hund 1 und 3 bis zum 10. Tag, bei Hund 2 dagegen reagieren die Proben ab dem 6. Tag gleichartig (Tabelle 3). Bei Hund 4 sind nur am 6. Tag 2-ME-labile, komplementbindende Antikörper nachzuweisen (Tabelle 3).

2. Befunde an Mäusen

2a. Reaktionen im Sabin-Feldman-Test

Bei den Sera der Mäuse tritt erstmalig am 9. Tag p. i. nach Inaktivierung bei 56° C ein Titer von 1:4 auf.

Vom 10. Tag, an dem der Titer nach der Inaktivierungstemperatur von 56° C 1:50 beträgt, steigt der Antikörper-Titer am 11. Tag auf 1:400, erreicht am 14. Tag den Wert 1:800 und zeigt am 21. Tag den Maximalwert von 1:3.000. Am 11. Tag sind 60° C-resistente Antikörper zum ersten Mal mit einem Titer von 1:100 nachweisbar. Ab dem 12. Tag bis zum 18. Tag liegt der Titer bei der Inaktivierung bei 60° um eine Titerstufe niedriger als derjenige bei 56° C. Die 2-ME-resistenten Antikörper treten ebenfalls am 11. Tag auf, liegen an diesem und am nächsten Tag eine Stufe niedriger als die wärmestabilen und laufen ab dem 13. Tag parallel mit diesen (Tabelle 4).

2b. Reaktionen in der Komplementbindungsreaktion

Durch 2-ME zerstörbare, komplementbindende Antikörper werden am 12. Tag p. i. gefunden. Einen Tag später treten 2-ME-resistente Antikörper in der gleichen Titerhöhe wie nach Inaktivierung desselben Serums bei 56° C auf. Im weiteren Verlauf sind keine wesentlichen Titerabweichungen der Ansätze einer Serumprobe festzustellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 und Tabelle 4 zusammengefaßt.

III. Diskussion

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß sowohl Hund als auch Maus nach einer primären Toxoplasma-Infektion als erstes 2-ME-labile Antikörper bilden. Da durch 2-ME die IgM-Immunglobuline zerstört werden, dürfte es sich auch bei diesen Tierespezies bei den zuerst gebildeten Antikörpern um Makroglobuline handeln.

Nach der oralen Infektion kommt es trotz einer geringen Infektionsdosis bei den Hunden schnell zur Ausbildung von 2-ME-resistenten Antikörpern, deren Titer aber bei Hund 1 weit unter denjenigen der 2-ME-labilen bleiben.

Bei Hund 2 wird hingegen am Ende der dritten Woche die Immunität durch die 2-ME-resistenten Antikörper getragen.

Das andersartige Verhalten von Hund 3, bei dem schon am 6. Tag 2-ME-resistente Antikörper in der gleichen Titerröhe wie nach Inaktivierung bei 56° C nachgewiesen werden, läßt sich möglicherweise so deuten, daß der Hund schon vor der experimentellen oralen Infektion mit Toxoplasma-Antigen in Berührung gekommen ist, wofür das gegenüber den anderen Hunden vergleichsweise hohe Alter (4 1/2 Jahre) des Tieres sprechen könnte. Für die erste Hypothese spricht das Verhalten der Hunde 1 und 2 und des Hundes 3 selbst nach einer Reinfektion; denn hier kommt es ebenfalls innerhalb von vier bis fünf Tagen zu einem gleichzeitigen und fast gleich hohen Anstieg der Titer unabhängig von der Behandlung mit 2-ME.

Bei Hund 2 ist nach der oralen Infektion ein zweiphasiges Immungeschehen insofern zu beobachten, als in der 2. und 3. Infektionswoche die 2-ME-labilen Antikörper wie bei Hund 1 bei weitem überwiegen. Danach kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Sabin-Feldman-Titers, der hauptsächlich von den IgG-Antikörpern getragen wird.

Die in der Literatur beschriebene Korrelation zwischen 2-ME- und Wärmeresistenz der Antikörper (13) wird auch in diesen Versuchen gesehen. Aus dem Verhalten der Antikörper von Hund 1 am 21., 24. und 25. Tag, die bei 60° C zerstört werden, nach 2-ME-Behandlung aber einen Titer von 1:24 aufweisen, könnte man schließen, daß beide Verfahren - Erwärmung und 2-ME-Behandlung - nicht an derselben Stelle des Antikörpermoleküls angreifen.

Andererseits wird diese Diskrepanz nicht bei Hund 2, 3 und den Mäusen und selbst bei Hund 1 nur viermal beobachtet, so daß es denkbar wäre, daß das Serum an diesen Tagen nicht genügend Schutzkolloide enthielt und es somit zu einer Denaturierung der Globuline kam (Berger, persönliche Mitteilung).

Nach der peroralen Infektion werden nur bei dem Hund 2 nach dem zweiten Anstieg des Antikörpertiters in der vierten Infektionswoche durch 2-ME zerstörbare komplementbindende Antikörper registriert. Die Antigendosis führte zwar zur Bildung von spezifischen neutralisierenden 7 S Antikörpern, aber nicht zur Bildung komplementbindender Antikörper.

Nach einer Reinfektion der Hunde kommt es nach einer Latenzzeit von vier Tagen zu einem sehr steilen Anstieg des Antikörpergehaltes, deren 2-ME-Resistenz sie in die Klasse der IgG einreicht. Daß der Organismus in diesem Falle vorwiegend IgG Antikörper produziert, ohne vorher in deutlich meßbarer Menge IgM Antikörper auszuschütten, beruht nicht auf der - gegenüber der oralen Infektion - hohen Infektionsdosis oder dem anderen Infektionsweg. Das zeigt das Verhalten des Hundes 4, der ebenfalls eine hohe Dosis Toxoplasmen i. v. injiziert bekommt. Bei ihm treten ebenfalls zwischen dem vierten und fünften Tag Antikörper auf; deren Titer ist aber am vierten Tag durch 2-ME-Behandlung

vollig und am fünften Tag deutlich reduzierter. Am sechsten Tag hat dieser Hund zwar einen Titer von 1:3000; durch Zerstörung der Iga fällt er aber auf einen Wert von 1:50.

Deutlichere Unterschiede zwischen den Verfahren - Inaktivierung bei 56° C und 2-ME-Behandlung - treten nach der Reinfektion bei Hund 1 und 3 in der Komplementbindung zutage. Hier fällt zwischen dem vierten und siebten bzw. zehnten Tage die KBR deutlich schwächer aus.

Auch bei Hund 2, der schon am Tage der Reinfektion 2-ME-resistente Antikörper aufweist, vermehren sich zuerst die durch 2-ME zerstörbaren komplementbindenden Antikörper.

Bei den Mäusen und bei Hund 4 treten ebenfalls zuerst nach der Injektion 2-ME-labile Antikörper in der KBR auf.

Es wird somit gezeigt, daß sowohl der Hund, die Maus (12) wie das Rind (13), das Schaf (10; 11) und das Kaninchen (12) auf eine primäre Toxoplasma-Infektion mit der Bildung von 19 S oder Iga Globulinen reagieren und daß der Titeranstieg im SFT nach einer Reinfektion auf einer unmittelbaren Vermehrung der IgG Globuline beruht, sofern der primäre Reiz die Bildung dieser Globuline induziert hat. Bei den Hundeexperimenten löste die Primärinfektion nur bei einem Tier die Bildung von komplementbindenden Antikörpern aus, die in diesem Fall zur Klasse der Iga Globuline gehörten. So wurde die Reinfektion im Gegensatz zum SFT in der KBR zuerst mit der Bildung von 19 S Antikörpern beantwortet wie nach einer Primärinfektion (Hund 4). Dies steht im Einklang mit der Hypothese (5), daß nur die IgG produzierenden Zellen ein immunologisches Gedächtnis besitzen.

Nach Primärinfektion besteht in den ersten Tagen nach Auftreten der Antikörper eine geringe Diskrepanz im

Titer nach Inaktivierung der Sera bei 60° C oder Behandlung mit 2-ME. Dieser Titerunterschied gleicht sich sehr schnell aus, bleibt aber gegenüber dem Titer nach Inaktivierung bei 56° C bis zur dritten Infektionswoche bestehen, was besonders deutlich aus dem Mäuseversuch hervorgeht.

Es läßt sich also auch bei Tiersera durch Bestimmung der Igm oder IgG Toxoplasma-Antikörper in einer Serumprobe eine bedingte Aussage über den Zeitpunkt der Infektion machen, indem man in einem unbekannten Serum die besprochenen Immunglobulinarten bestimmt. Findet man nur 19 S Antikörper, ist der Organismus im Begriff, sich mit dem Toxoplasma-Antigen auseinanderzusetzen, trifft man dagegen nur auf 7 S Antikörper, kann man den Schluß ziehen, daß eine bleibende Immunität eingetreten ist, wobei es bei einem unbekannten Serum natürlich offen bleibt, wie lange diese dauernde Immunität schon besteht.

IV. Zusammenfassung

1. Nach experimenteller, oraler Toxoplasma-Infektion mit dem DX-Stamm erscheinen beim Hund als erste Antikörper solche, die nach einer Behandlung des Serums mit 2-Mercaptoathanol verschwinden. Diese 2-ME labilen Antikörper gehören zur Klasse der Makroglobuline - IgM -, da nur sie durch 2-ME zerstört werden.

2. Am dritten Tag nach Beginn der Antikörperbildung differieren bei Hund 1 und 2 die Titer der Sera, die bei 60° inaktiviert oder mit 2-ME behandelt wurden, um eine Stufe.

Dieser Unterschied besteht etwa 24 Stunden, bleibt aber bis zur dritten Injektionswoche deutlich gegenüber dem Titer der Sera, die bei 56° C inaktiviert wurden.

3. Nach intravenöser Reinfektion der Hunde mit dem BK-Stamm steigen die Antikörpertiter nach 7 Tagen (Hund 1 und 3) bzw. 9 Tagen (Hund 2) auf ihre Maximalwerte. Diese Antikörper sind 2-ME resistent und weisen damit auf ihre Zugehörigkeit zur Klasse der IgG.

4. Bei den nach intraabdominaler Toxoplasma-Infektion der Maus zuerst erscheinenden Antikörpern handelt es sich ebenfalls um 2-ME labile - IgM -, aber schon 24 Stunden danach lassen sich auch 2-ME resistente Antikörper im SFT und der KBR nachweisen.

5. Es ergibt sich daraus, daß man auch bei Hund und Maus durch Bestimmung der IgM und IgG Toxoplasma-Antikörper einen Anhaltspunkt über den Zeitpunkt der Infektion gewinnen kann.

Fortsetzung von Tabelle 1:

19	20	21	22	23	24	25	27	31	51	60	83
		1:100			1:100	1:100		1:100	1:24		
		0			0	0		0	1:24		
		1:24			1:24	1:24		1:24	1:24		
	1:100	1:100		1:400	1:400		1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
	1:24	1:24		1:200	1:200		1:400	1:400	1:400	1:400	1:100
	1:24	1:24		1:200	1:200		1:400	1:400	1:400	1:400	1:100
	1:200				1:100						
	1:200				1:100						
	0	0	0	0	1:5 ⁴			1:5 ³		1:5 ³	
	0	0	0	0	0			0		0	

0 = negativer Ausfall;
leere Felder: keine Titerbestimmung.

Tabelle 2: Ausfall des Sabin-Feldman -Tests nach intravenöser Toxoplasma-Infektion in Abhängigkeit von Inaktivierungstemperatur oder 2-Mercaptoethanol-Behandlung.

Tage p. i.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	18
Hund 1															
56° C	1:24	1:24	1:24	1:24	1:200	1:6400	1:25000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000		
60° C	1:24	1:24	1:24	1:24	1:200	1:800	1:6400	1:25000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000		
2-ME	1:24	0	1:24	1:50	1:1600	1:25000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000		
56° C	1:200	1:100	1:100	1:100	1:200	1:1600	1:6400	1:25000	1:96000	1:96000	1:96000	1:25000			
60° C	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:800	1:1600	1:25000	1:96000	1:96000	1:96000	1:25000			
2-ME	1:100	1:100	1:100	1:100	1:200	1:1600	1:6400	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000	1:96000			
56° C	1:100	1:100	1:100	1:100	1:400	1:1600	1:6400	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000
60° C		1:100			1:1600					1:6400					
2-ME	1:100	1:400	1:400	1:400	1:1600	1:1600	1:6400	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:25000	1:6400	1:6400
Hund 4															
56° C	0	0	0	0	1:50	1:1000	1:4000	+							
60° C	0	0	0	0	0	1:200	1:1000	+							
2-ME	0	0	0	0	0	1:24	1:50	+							

0 = negativer Ausfall;
leere Felder: keine Titerbestimmung.

Tabelle 3:

Ausfall der Komplementbindungsreaktion nach intravenöser Toxoplasma-Infektion in Abhängigkeit von 2-Mercaptoethanol-Behandlung.

Tage p. i.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	17	18
Hund 1	56° C	0	0	0	1:5 ⁺	1:20 ⁴	1:80 ³				1:320 ³	1:320 ²		
	2-ME	0	0	0	0	1:10 ³	1:20 ⁴				1:80 ³			
Hund 2	56° C	1:5	1:5	1:5	1:10 ⁺	1:80 ³	1:160 ³	1:160 ³	1:320 ³	1:320 ³	1:320 ³	1:320 ³		
	2-ME	1:5	1:5	1:5	1:5	1:40 ³	1:160 ³	1:160 ³	1:320 ³	1:320 ³	1:320 ³	1:320 ³		
Hund 3	56° C	0	0	0	1:10 ²	1:80 ²	1:160 ¹	1:320 ²		1:640 ⁴		1:320 ⁴	1:320 ⁴	1:640 ⁺¹
	2-ME	0	0	0	0	1:20 ³	1:20 ³	1:160 ⁴		1:160 ⁴		1:640 ²	1:320 ²	1:320 ²
Hund 4	56° C	0	0	0	0	0	1:5 ³							
	2-ME	0	0	0	0	0	0							

0 = negativer Ausfall;
leere Felder: keine Titerbestimmung

Tabelle 4:

Ausfall des Sabin-Feldman -Tests und der Komplementbindungsreaktion nach
intraabdominaler Toxoplasmainfektion der Maus in Abhängigkeit von
Inaktivierungstemperatur oder 2-Mercaptoethanolbehandlung

Tage p. i.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
56° C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:50	1:400	1:400	1:800	1:800	1:800	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:3200
50° C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:100	1:200	1:400	1:400	1:400	1:800	1:800	1:1600	1:800	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:3200
2-ME	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:50	1:100	1:400	1:400	1:800	1:800	1:1600	1:1600	1:800	1:800	1:1600	1:1600	1:3200	1:3200
56° C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:5	1:10	1:10	1:10	1:40	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:320 ²	1:80	1:320 ²
2-ME	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:10	1:10	1:10	1:40	1:160	1:80	1:160	1:160	1:80	1:80	1:80	1:80

0 = negativer Ausfall;
leere Felder: keine Titerbestimmung

Abbildung 1

Ausfall des Sabin - Feldman - Tests (SFT) und der Komplementbindungsreaktion (KBR) (Hund 2)
nach peroraler Toxoplasma - Infektion in Abhängigkeit von Inaktivierungstemperatur
oder 2 - Mercaptoethanol - Behandlung (2-ME)

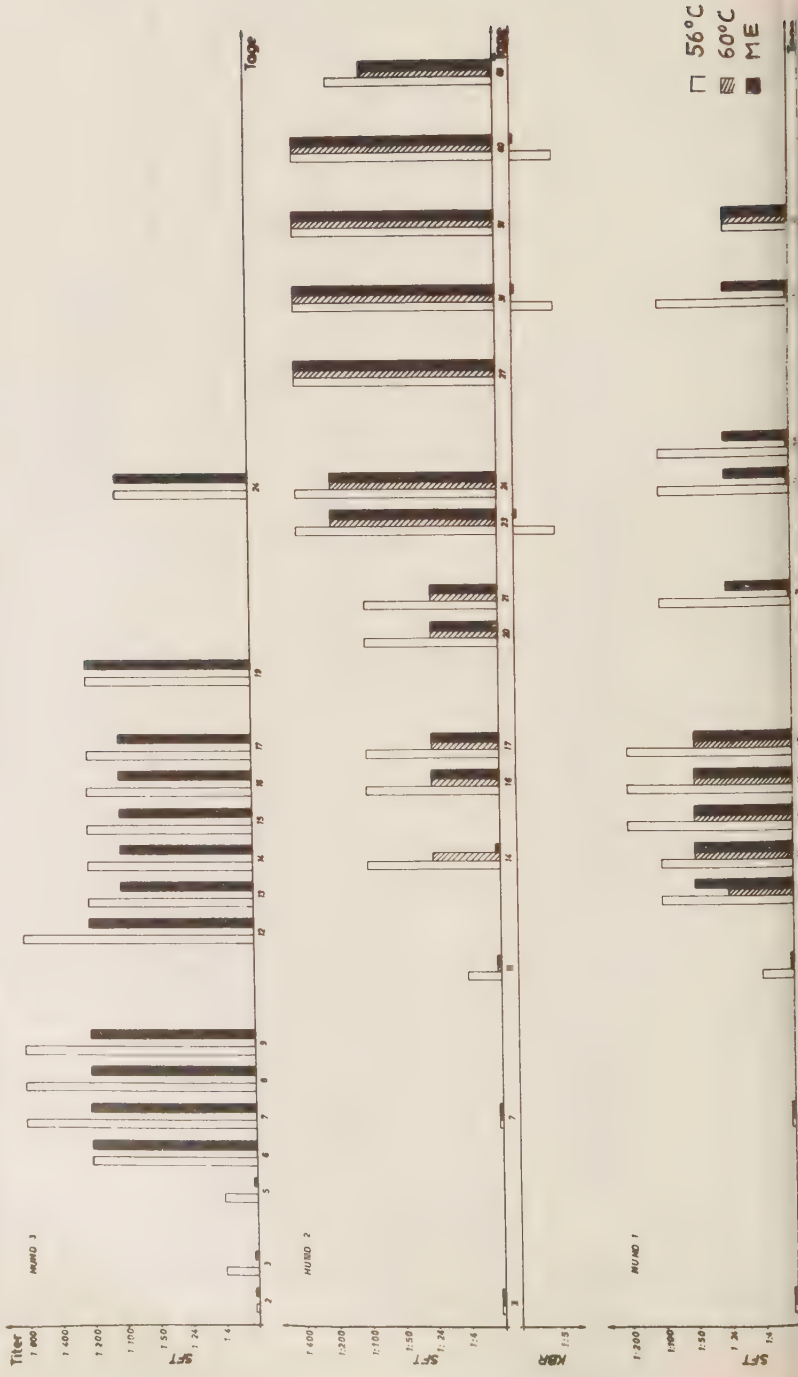


ABBILDUNG 2

AUSFALL des SABIN-FELDMAN -Tests (SFT) und der KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION (KBR) nach intravenöser Toxoplasma-Infektion in Abhängigkeit von Inaktivierungstemperatur oder 2-Mercaptoethanol-Behandlung (2-ME)

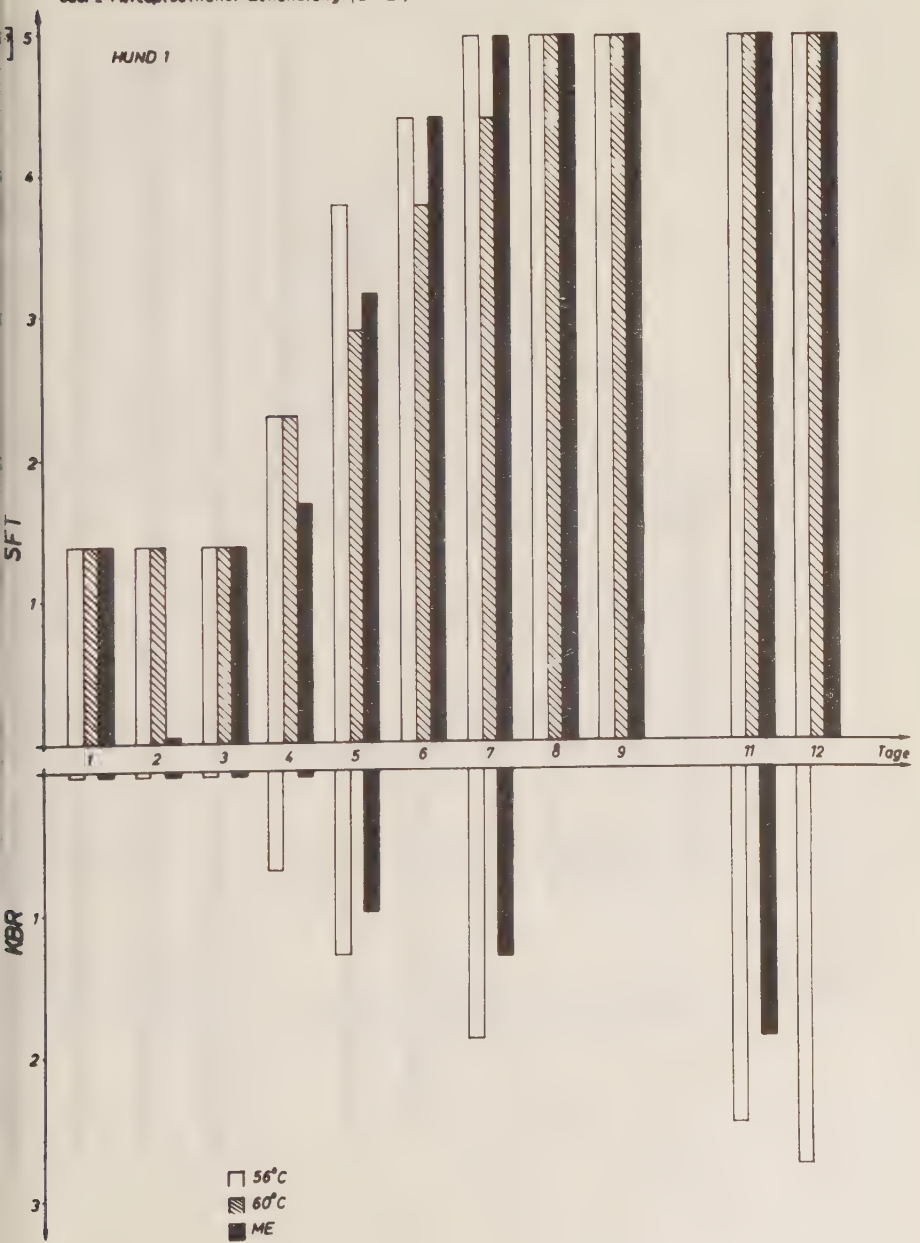


ABBILDUNG 3

Ausfall des Sabin-Feldman - Tests (SFT) und der Komplementbindungsreaktion (KBR) nach intravenöser Toxoplasma-Infektion in Abhängigkeit von Inaktivierungstemperatur oder 2-Mercaptoethanol-Behandlung (2-ME)

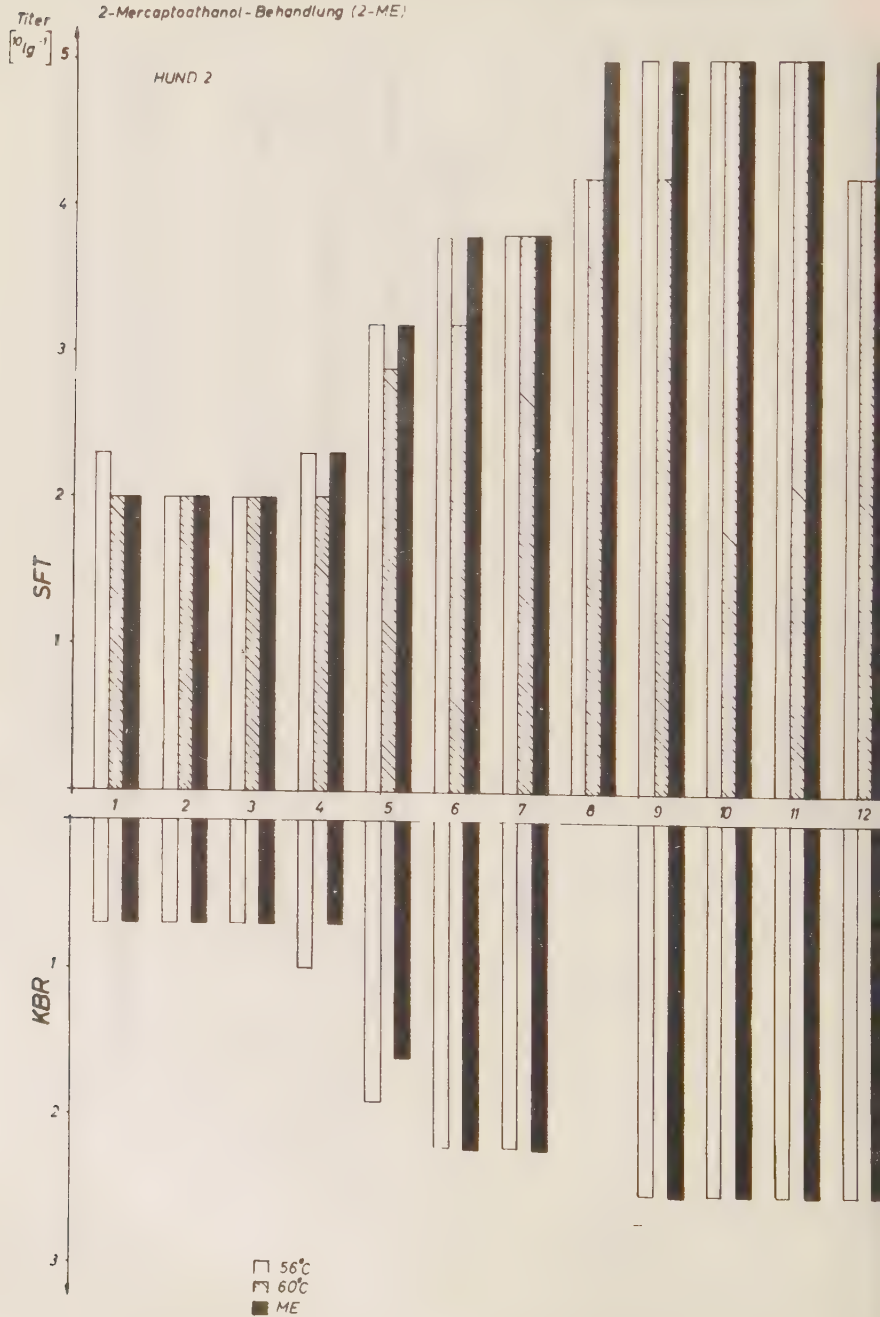


Abbildung 4

Ausfall des Sabin - Feldman - Tests (SFT) und der Komplementbindungsreaktion (KBR) nach intravenöser Toxoplasma - Infektion in Abhängigkeit von Inaktivierungstemperatur oder 2-Mercaptoethanol - Behandlung (2-ME)

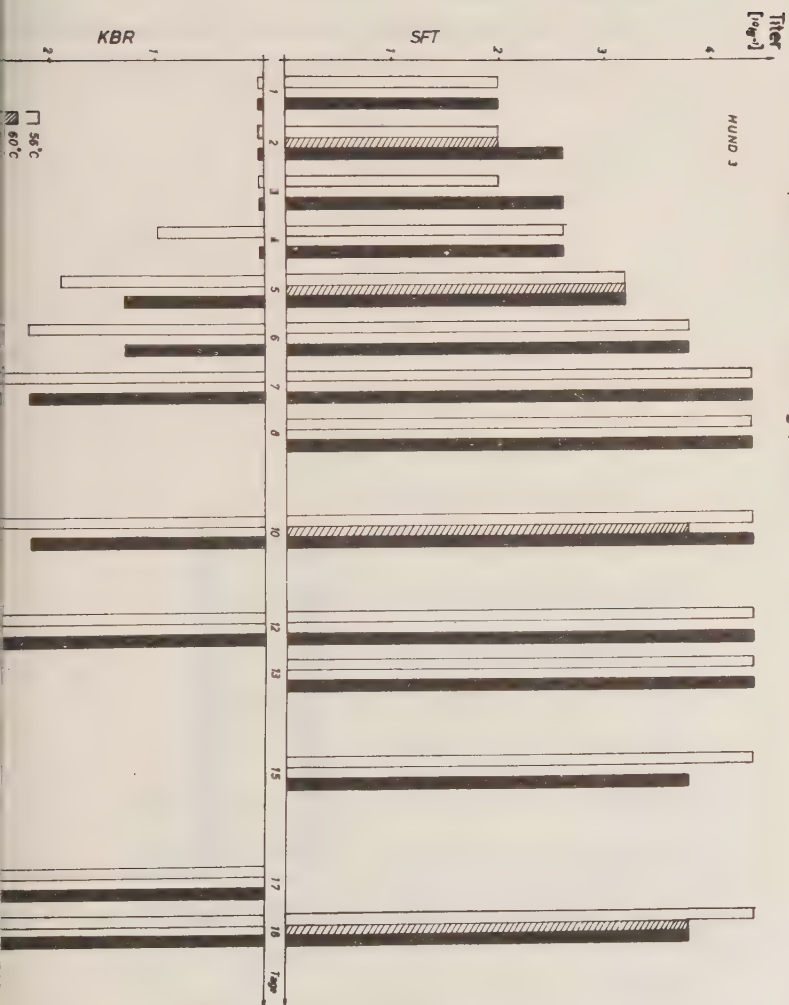


ABBILDUNG 5

Ausfall des Sabin-Feldman -Tests (SFT) und der Komplementbindungsreaktion (KBR) nach intravenöser Toxoplasma -Infektion in Abhängigkeit von Inaktivierungstemperatur oder 2-Mercaptoäthanol - Behandlung

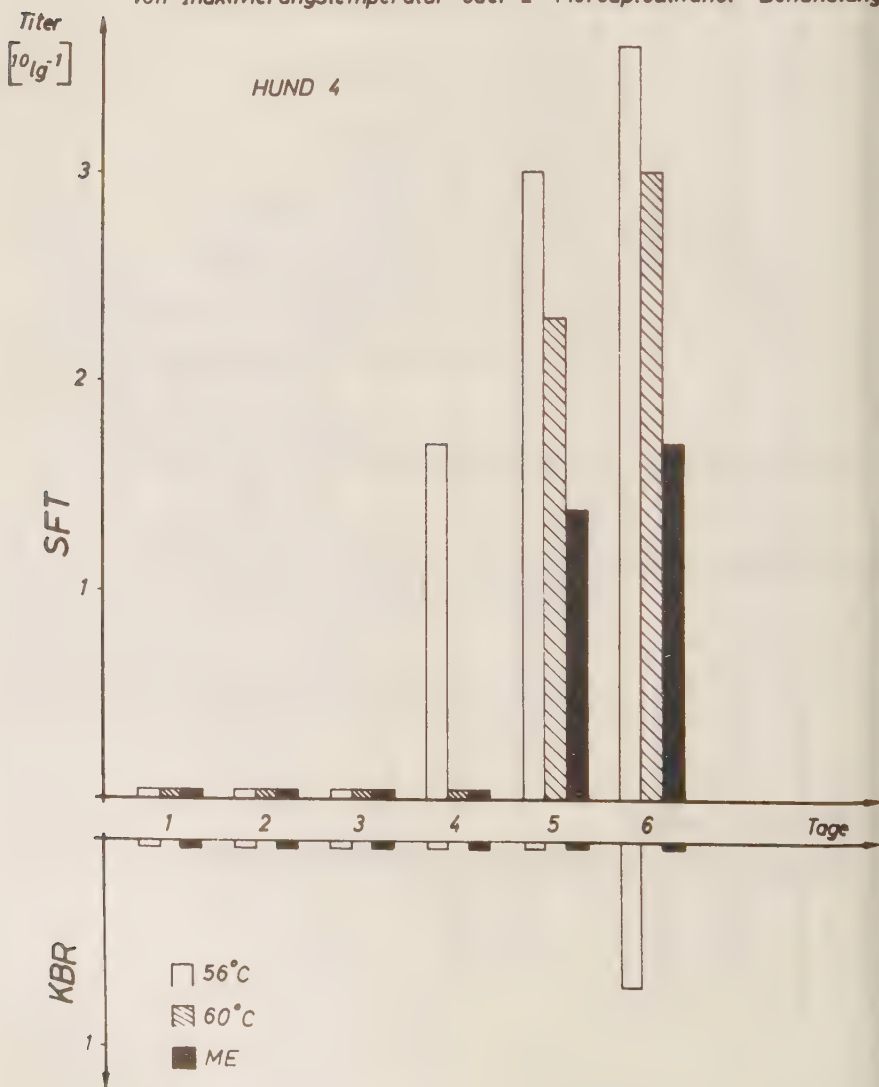
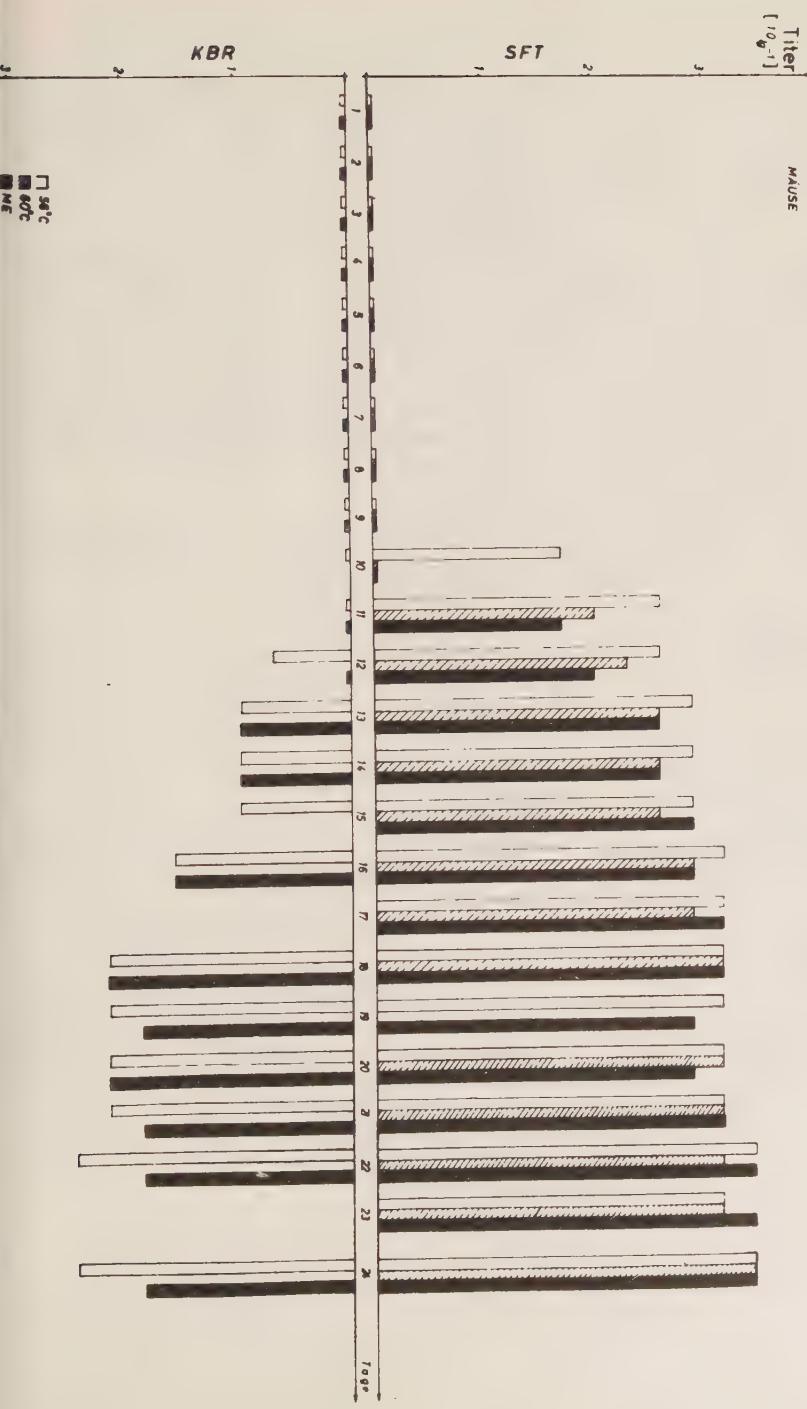


Abbildung 6

Ausfall des Sabin - Feldman - Tests (SFT) und der Komplementbindungsreaktion (KBR) nach intraabdominaler Toxoplasma - Infektion in Abhängigkeit von Inaktivierungstemperatur oder 2-Mercaptoäthanol - Behandlung (2-ME)



Literaturverzeichnis

1. Jerne, N.K.: Genetische und zelluläre Diversität in der Antikörperbildung
Zbl. Bakt. I. Orig. 205, 32-37, 1967
2. Cohen, S.: The Structure of Antibody
in: Samter, M., Editor, Immunological Diseases, 32-46,
Little, Brown & Company, Boston, 1965
3. Günther, O.: Die Entwicklung der Immunität
Dtsch. med. Wschr. 89, 2449-2454, 1964
4. Svehag, S.-E. and B. Mandel: The Formation and Properties of Polio-virus-Neutralizing Antibody:
I. 19 S and 7 S Antibody Formation: Differences in Kinetics and Antigen Dose Requirement for Induction
J. Exp. Med. 119, 1-20, 1964
5. Mannik, M. and H.G. Kunkel: The Immunoglobulins
in: Samter, M., Editor: Immunological Diseases, 278-297,
Little, Brown & Company, Boston, 1965
6. Remington, J.S. and M.J. Miller: 19 S and 7 S Anti-Toxoplasma Antibodies in Diagnosis of Acute Congenital and Acquired Toxoplasmosis
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 121, 357-363, 1966
7. Aelund, O., J.W. Osebold, F.A. Murphy and R.A. Di Capua: Antibody Heterogeneity in Experimental Listeriosis
J. of Immunol. 97, 150-157, 1966
8. Rose, I.E., M.H. Roepke and D.R. Briggs: Physicochemical Properties of Nonspecific Bovine Seroagglutinins for Brucella abortus
Amer. J. Vet. Res. 25, 118-121, 1964
9. Dieselben: Physicochemical Studies on Postvaccinal Brucella Agglutinins in Bovine Serum
Amer. J. Vet. Res. 25, 325, 1964
10. Te Punga, W.A.: Toxoplasmosis in Sheep
2. Serological Response in the Early Stages of Infection
New Zealand Veterinary Journal 12, No. 6, 153-155, 1964

1. Te Punga, W.A., and M.E.Penrose:
Toxoplasmosis in Sheep
1.Naturally-Occuring Heat-Stable and Heat-Labile Antibodies and Accessory Factor-Like Activity in Sheep Sera
New Zealand Veterinary Journal 12, No.6, 150-152, 1964
2. Staib,F., H.P.R.Seeliger und J.Cura:
Orientierende Untersuchungen zur Bildung 2-Mercaptoäthanol-empfindlicher und -resistenter Antikörper bei der experimentellen Toxoplasma-Infektion
Z.med.Mikrobiol.u.Immunol.153, 20-30, 1966
3. Berger,J.:
Zur Epidemiologie der Toxoplasmose 2-Mercaptoäthanol-Resistenz und Hitze-stabilität der Antikörper des Rindes
Arch.Hygiene 152, 523-535, 1968.
4. Bleier,W., E.Otten und A.Siegert:
Hämatologisch-serologische Untersuchungen an parenteral mit Toxoplasma gondii infizierten Hunden
Mh.prakt.Tierheilk. 4, 458-463, 1952
5. Otten,E.:
Statistische Unterlagen zur Toxoplasmose-Komplementbindungsreaktion
Dtsch.tierärztl.Wschr.59,166, 1952
6. Boch,J., und M.Rommel:
Serologische Untersuchungen an Berliner Hunden auf Toxoplasmose
Berl.u.Münch.Tierärztl.Wschr.76, 292-296, 1963
7. Seyerl,Fr.v.:
Zur Diagnose der Toxoplasmose des Hundes
Tierärztl.Umschau 19, 390-392, 1964
8. Buri,H., G.Piekarski und E.Scupin:
Zur Frage der Ausscheidung von Toxoplasma gondii bei gesund erscheinenden Hunden
Die Kleintierpraxis 2, 157-169, 1964
9. BGesBl. 23,354-357,1966:
Empfehlungen für die Durchführung der Toxoplasma-Seroreaktion
I. SFT
II.KBR

Am Schluß dieser Arbeit ist es mir ein Bedürfnis,
Herrn Prof. Dr. G. Schoop meinen herzlichsten Dank
für die Überlassung des Themas auszusprechen und für
die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Sehr herzlichen Dank sage ich auch Herrn Dr. J. Berger
für seine stete Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung
in die Serologie der Toxoplasmose.

Schließlich gilt mein besonderer Dank auch Frau I. Lippel
für ihre freundliche technische Assistenz.

Lebenslauf

Am 21. Februar 1940 kam ich, Jutta Kreibig, als Tochter des Schriftstellers Kurt Pergande und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Geguszies, in Hamburg zur Welt.

Dort begann meine Schulzeit im Frühjahr 1946 mit dem Besuch der Volksschule.

Ostern 1952 wechselte ich an das Gymnasium für Mädchen, Heilwig-Schule über, ebenfalls in Hamburg.

Nach bestandenem Abitur im Februar 1960, begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover, wo ich im April 1963 mein Physikum ablegte.

Vom Sommersemester 1963 bis zur Absolvierung der Tierärztlichen Prüfung am 2. Juni 1966, studierte ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Nach der Bestellung als Tierarzt am 1. Dezember 1967, wurde ich zum 1. April 1968 als wissenschaftliche Angestellte im Bundesgesundheitsamt, Berlin, eingestellt.

Am 10. September 1964 heiratete ich in Berlin-Zehlendorf den damaligen Gerichtsreferendar Klaus W. Kreibig.

